

UTILISATION DE SUCRES ET DE POLYOLS PAR LA MYCOFLORE D'*ABIES ALBA* MILL. 1. MUCORALES

par F. GOURBIERE*

RÉSUMÉ. — Utilisation de 25 sucres et polyols par 12 Mucorales de la litière d'*Abies alba* Mill. Conséquences écologiques possibles des différences observées, en particulier entre les *Mortierella* subg. *Micromucor* (*M. ramanniana*, ...) et les *Mortierella* subg. *Mortierella* (*M. parvispora*, *pulchella*, ...).

SUMMARY. — Utilization of 25 sugars and polyols by 12 Mucorales from *Abies alba* Mill. litter. Ecological significance of observed differences, especially between *Mortierella* subg. *Micromucor* (*M. ramanniana*, ...) and *Mortierella* subg. *Mortierella* (*M. parvispora*, *pulchella*, ...).

Les microflores fongiques jouent un rôle important dans la dégradation des débris végétaux. De nombreux travaux se sont attachés à décrire les successions de microorganismes colonisant ces substrats mais peu de recherches ont été menées dans le but de comprendre les mécanismes de ces successions et leur place exacte dans le processus de dégradation.

L'étude de la nutrition *in vitro* des champignons peut contribuer à la compréhension de leur rôle; même si l'on ne doit pas en attendre l'explication immédiate des faits observés dans la nature, du moins peut on espérer mettre en évidence des groupes physiologiques et les comparer aux groupes successionnels.

Cette comparaison entre la distribution dans le temps des espèces et leurs aptitudes physiologiques peut être conduite à la lumière de deux hypothèses, en partie complémentaires, mais aussi partiellement contradictoires.

* Laboratoire d'Écologie Végétale, Université Lyon I, Bat. 741, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1 - Les groupes successionnels sont des groupes nutritionnels homogènes, c'est-à-dire qu'à un moment donné les colonisateurs présents utilisent le même type de substrat puis, celui-ci épuisé, d'autres champignons prennent la relève pour dégrader une autre fraction du matériel végétal (dégradation séquentielle du substrat).

2 - Un groupe nutritionnel est formé d'un ensemble d'espèces vivant dans un même milieu, donc en état de compétition. Dans ces conditions leur coexistence implique au contraire leur différenciation nutritionnelle, chacun exploitant une fraction différente du matériel végétal.

Reconnaissons que cette problématique est destinée à l'analyse du type de résultats présentés ici, mais lors d'une synthèse écologique il faudrait tenir compte d'autres facteurs de ségrégation des espèces (topographiques, saisonniers...).

Nous avons pour notre part étudié les microflores fongiques associées à la dégradation des aiguilles de Sapin (GOURBIERE, 1980) et nous abordons ici l'étude de leur nutrition, en l'occurrence l'utilisation de carbohydrates simples : sucres et polyols.

Ce premier travail portant sur les Mucorales permettra de savoir si un groupe relativement bien défini au point de vue systématique et successionnel est homogène sur le plan nutritionnel vis-à-vis des substrats étudiés. Choix d'autant plus justifié que ces champignons sont réputés être des «sugars fungi» secondaires, utilisant les composés simples libérés du substrat par d'autres décomposeurs.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

A. - MATÉRIEL

Les souches étudiées ont été isolées de la litière d'*Abies alba* dans notre station (GOURBIERE, 1979). Nous avons suivi GAMS (1977) pour la systématique du genre *Mortierella* en donnant toutefois la synonymie avec le travail de ZYCHA et al. (1969). Toutes les identifications ont été confirmées par le CentraalBureau voor Schimmelcultures (Baarn). Les numéros de souches sont ceux de notre mycothèque.

Famille Mucoraceae :

Mucor hiemalis Wehmer (A8)

Absidia coerulea Bainier (A13)

Famille Mortierellaceae

subg. *Micromucor*

Mortierella isabellina Oudemans (A26)

Mortierella ramanniana (Moeller) Linnemann (A36)

- Mortierella ramanniana* var. *angulispora* (Naumov) Linnemann (A7)
 subg. *Mortierella*
 section *alpina*
Mortierella alliacea Linnemann (A40)
 section *hygrophila* :
Mortierella bainieri Costantin (A41)
Mortierella hyalina (Harz) W. Gams (= *M. hygrophila* Linnemann)
 (A37)
 section *stylospora* :
Mortierella verticillata Linnemann (= *M. marburgensis* Linnemann)
 (A25)
 section *spinosa*
Mortierella pulchella Linnemann (A2)
Mortierella parvispora Linnemann (A35)
Mortierella exigua Linnemann (A62)

B. - MÉTHODE

1. Milieu de culture

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,1 g
yeast-extract «DIFCO»	0,5 g
glucose	10,0 g
eau distillée	100 ml

Le pH du milieu est de 5,1. Les autres sucres et polyols (produits PROLABO ou ROTH) sont dosés de façon à apporter la même quantité de carbone (4g par litre).

Pratiquement ce milieu est préparé en deux fractions (sels et extrait de levure d'une part, sucre d'autre part) stérilisées séparément 15 minutes à 120°C, puis réunies aseptiquement pour reconstituer 20 ml de milieu par tube de 22 x 220 mm.

2. Inoculum et culture

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 15 jours sur extrait de malt liquide (2%) dans un tube incliné contenant une dizaine de billes de verre (1mm de diamètre). Une simple agitation rapide au Vortex permet d'obtenir une suspension (spores + mycélium) servant d'inoculum à raison de 0,5 ml par tube.

Les tubes (3 par essai) sont inclinés pour obtenir une surface de culture maximale et incubés à 20 ± 1°C à la lumière diffuse. Cette variante de la culture en surface sur milieu liquide non agité s'est révélée bien adaptée à la réalisation

d'un grand nombre d'essais et comparable aux expériences classiques en erlenmeyers.

3. Détermination du poids sec

Le mycélium est recueilli par filtration sur filtre Durieux n° III (5,5cm de diamètre) pesé au préalable (après dessiccation à l'étuve). L'ensemble est lavé, séché à l'air puis à l'étuve à 75°C pendant 12 h. Les pesées sont faites après refroidissement des filtres au dessiccateur. La précision est de 0,1 mg.

C. - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La méthodologie idéale consisterait à optimiser le milieu (pH et source azotée en particulier) pour chaque espèce et à rechercher pour chaque substrat le temps optimum de culture. Le choix plus ou moins arbitraire d'un milieu et d'un temps de culture conduit à s'écarter du poids maximal de mycélium formé, ce qui pose des problèmes d'interprétation souvent exprimés en terme de bonnes ou mauvaises sources de carbone. Nous avons accordé quelque attention à ce problème.

1. Précision des mesures

Nous avons calculé l'écart type pour chaque essai (3 répétitions) et nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

- l'intervalle de confiance au risque 0,05 (2 écarts type) est presque toujours inférieur à 10 mg (6 exceptions sur 312 essais),
- il est le plus souvent (277 essais sur 312) inférieur à 5 mg, soit une erreur relative de 10% sur un essai positif de 50 mg et de 100% sur un essai négatif de 5 mg (l'écart type ne semble pas dépendre beaucoup de la valeur de l'essai).

2. Croissance sur glucose (Tab. 1)

Jours de culture	7	14	21	28	35	a	b
<i>M. isabellina</i>	79	69	63	62	61	0,79	0,38
<i>M. ramanniana</i>	38	64	65	62	60	0,96	0,31
<i>M. ram. var. angulispora</i>	49	71	70	67	63	0,94	0,34
<i>M. hiemalis</i>	31	32	38	41	43	0,96	0,20
<i>A. coerulea</i>	64	63	59	61	61	0,95	0,30
<i>M. alliacea</i>	45	50	45	37	37	0,74	0,24
<i>M. bainieri</i>	54	62	56	51	49	0,82	0,29
<i>M. hyalina</i>	44	42	37	35	39	0,80	0,21
<i>M. verticillata</i>	45	46	45	43	42	0,92	0,22
<i>M. pulchella</i>	28	45	52	51	50	0,97	0,25
<i>M. parvispora</i>	52	61	62	58	52	0,93	0,30
<i>M. exigua</i>	2	18	26	27	30	0,92	0,14

Tableau 1. — Croissance sur glucose. Poids sec en mg pour 200mg de substrat apporté. a : rapport poids sec à 28 jours/poids sec maximum. b: rapport poids sec maximum/poids de substrat apporté.

C'est elle qui a servi de test pour le choix du milieu et du temps de culture. Le rapport poids sec maximum/poids de matière organique fournie (210 mg) est compris entre 0,20 et 0,38 (sauf pour *M. exigua* : 0,14). PERLMAN (1965) donne des valeurs de 0,20 à 0,40 pour le rapport poids de mycélium formé/poids de matière organique utilisée (donc à priori supérieur au précédent). Le milieu utilisé semble donc satisfaisant, sauf pour une espèce.

3. Temps de culture

Le tableau 1 montre que, compte tenu de la précision des mesures, le maximum de croissance est atteint en 14 jours (sauf à nouveau pour *M. exigua*). Nous avons toutefois retenu une incubation plus longue (28 jours) pour tenir compte d'éventuels phénomènes d'adaptation enzymatique ou de croissance plus lente que sur glucose. Le rapport poids de mycélium à 28 jours/poids maximum de mycélium formé (toujours supérieur à 0,75) montre que l'on n'a pas, dans le cas présent, à craindre des phénomènes d'autolyse trop importants.

4. Signification des résultats

Pour interpréter les poids de mycélium formés sur les différents substrats nous avons retenu les critères suivants :

- 0 - 9 mg : pas d'utilisation du substrat (154 cas)
- 9 - 14 mg : substrat probablement non utilisé (6 cas)
- 15 - 19 mg : substrat probablement utilisé (7 cas)
- 20 et plus : substrat utilisé (133 cas).

On constate que fort heureusement les valeurs ambiguës sont restées rares et dans la discussion seul le cas du ribose sera exclu, les résultats étant par trop incertains.

Il est à noter que si 4 des valeurs intermédiaires sont isolées, les autres se regroupent sur trois substrats : D-arabinose (3), D-ribose (5) et glycérol (2) un peu marginaux : le D-arabinose n'est pas un isomère naturel, le D-ribose est un constituant d'acides nucléiques et le glycérol de glycérides.

II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

Des conclusions définitives nécessiteraient l'étude de plusieurs souches de chaque espèce et l'extension à d'autres espèces. Toutefois certaines hypothèses peuvent être proposées, d'autant plus que les espèces voisines présentent des comportements similaires.

Toutes les Mucorales étudiées utilisent les hexoses glucose, fructose, mannose, galactose, les disaccharides maltose et tréhalose et le glycérol (exception de *M. exigua* qui n'utilise pas le galactose et le tréhalose). L'érythritol et l'inositol ne sont jamais utilisés.

	<i>M. isabellina</i>	<i>M. ramanniana</i>	<i>M. ram. var. angulispóra</i>	<i>M. hiemalis</i>	<i>A. coerulea</i>	<i>M. alliacea</i>	<i>M. bairneri</i>	<i>M. hyalina</i>	<i>M. verticillata</i>	<i>M. pulchella</i>	<i>M. parvispora</i>	<i>M. exigua</i>
témoin	4	4	4	3	4	2	2	2	3	3	4	3
monosaccharides												
glucose	62	62	67	41	61	36	51	35	43	51	58	26
fructose	63	66	66	41	65	38	57	38	39	52	60	22
mannose	65	61	61	45	60	40	56	37	42	51	58	30
galactose	68	63	62	47	61	39	48	31	41	38	54	3
L-sorbose	44	50	56	4	7	4	3	4	3	5	3	3
L-rhamnose	68	56	72	4	11	4	3	4	5	5	11	4
xylose	63	53	52	54	46	4	1	11	1	4	3	1
L-arabinose	62	54	46	41	6	3	4	1	4	1	3	2
D-arabinose	34	20	15	19	11	4	3	4	4	3	4	1
ribose	50	39	22	50	19	5	21	11	11	22	19	13
disaccharides												
maltose	64	63	62	27	27	39	57	22	20	42	23	25
tréhalose	65	65	61	42	30	41	46	38	42	50	58	2
lactose	64	54	67	4	6	2	3	4	3	6	5	1
cellobiose	62	67	63	32	38	4	4	5	5	6	7	2
saccharose	7	58	66	4	5	3	11	2	3	6	4	2
mélibiose	3	58	61	9	8	5	4	3	4	7	5	7
trisaccharides												
raffinose	3	60	66	5	11	4	4	2	3	4	3	4
melezitose	68	51	57	16	9	3	3	4	7	8	5	8
polyols												
glycêrol	53	62	67	20	17	30	30	42	38	46	56	17
erythritol	3	7	7	5	12	4	4	4	4	5	4	7
ribitol	67	59	57	51	9	3	3	5	3	3	3	3
glucitol	67	60	71	11	59	4	5	5	3	5	5	4
mannitol	67	64	62	5	66	3	4	6	5	4	4	3
galactitol	62	10	7	4	7	3	4	6	4	5	4	1
inositol	7	4	6	4	5	3	4	2	3	3	5	2

Tableau 2. — Croissance sur différents sucres et polyols. Poids sec à 28 jours de culture pour 200 mg de substrat (glucitol = sorbitol, ribitol = adonitol, galactitol = dulcitol).

Les autres substrats permettent de distinguer deux groupes de champignons :

- les espèces du sous-genre *Mortierella* n'utilisant aucun autre substrat,
- les espèces du sous-genre *Micromucor* utilisant tous les autres substrats sauf le galactitol qui n'est utilisé que par *M. isabellina*, qui en revanche n'utilise pas le saccharose, le mélibiose et le raffinose.

Notons que l'utilisation de ces trois derniers sucres est liée, les deux disaccharides étant des produits d'hydrolyse du raffinose. De nombreux cas semblables ont été analysés chez les levures (BARNETT, 1976).

Les deux représentants de la famille des Mucoraceae apparaissent intermédiaires entre les deux sous-genres de Mortierellaceae. Il faudrait tester d'autres souches et d'autres espèces avant de conclure.

stades de décomposition	Lo	L	F1	F2
<i>M. ramanniana</i>	0	0	16,2	23,8
<i>M. ram. var. angulispora</i>	0	0	0,8	0
<i>M. isabellina</i>	0	0	0,8	0
<i>M. hiemalis</i>	0,4	2,6	8,6	9,3
<i>A. coerulea</i>	0	0,7	0,3	3,2
<i>M. parvispora</i>	0	0,7	4,7	22,2
<i>M. pulchella</i>	0	1,7	11,6	2,6
<i>M. verticillata</i>	0	0	0	5,1
<i>M. hyalina</i>	0	0	0	2,2
<i>M. alliacea</i>	0	0	0,3	1,0
<i>M. bainieri</i>	0	0,3	1,0	0,7
<i>M. exigua</i>	0	0,3	0	0

Tableau 3. - Pourcentages d'aiguilles d'*Abies alba* Mill. colonisées par chaque espèce en fonction du stade de décomposition de l'aiguille (d'après GOURBIERE 1974, 1975, 1979).

D'après nos travaux antérieurs (GOURBIERE 1974, 1975, 1979) les Mucorales étudiées paraissent avoir une distribution semblable dans la Sapinière (Tab. 3). Absentes de la phyllosphère vivante et sénescence, elles apparaissent dans la litière et atteignent leur maximum dans la couche de fermentation (F1 et surtout F2). Il existe peut-être des variations saisonnières (*M. ramanniana* espèce du printemps, *M. hiemalis* d'automne) mais nos résultats à ce sujet devraient être vérifiés. Après stérilisation superficielle des aiguilles, ces espèces ne sont plus isolées (résultats à paraître), ce qui laisse supposer que ce sont des colonisateurs externes, comme l'ont déjà montré PARKINSON et al. (1967) chez *Pinus nigra*.

Nous admettrons toutefois la coexistence réelle de ces espèces, ce qui est le cas dans la plupart des prélèvements (GOURBIERE, 1979). Dans ces conditions nos deux hypothèses de départ semblent vérifiées, mais à des niveaux différents.

En effet, d'une part le groupe des Mucorales est bien différencié en deux (au moins) groupes, l'un très riche (*Micromucor*), l'autre très pauvre (*Mortie-*

rella) en possibilités nutritionnelles. Toutefois comme ce schéma devrait conduire à l'élimination du plus pauvre si les sucres étaient le seul point de compétition, il est probable que sur d'autres plans, la situation doit être inversée en faveur des espèces du sous-genre *Mortierella*. La faiblesse numérique des espèces intermédiaires fait penser à un phénomène d'exclusion par les deux ensembles extrêmes.

Mais par ailleurs, à l'intérieur de chaque groupe nutritionnel, la concurrence apparaît réelle et efficace, ne laissant la place qu'à une espèce principale. Ceci est très net pour les *Micromucor* où le groupe est dominé massivement par *M. ramanniana* var. *ramanniana*. Chez les *Mortierella* c'est *M. parvispora* qui est largement dominant, l'autre espèce abondante *M. pulchella* étant d'ailleurs légèrement décalée dans le temps (maximum en F1).

La signification des espèces mineures dominées, mais de capacités nutritionnelles identiques aux espèces dominantes pose un problème. Peut être s'agit-il de «contaminations» venues de microsites voisins : racines (les Mucorales sont abondantes sur les racines de *Pinus* (KUHLMAN, 1969) ou humus (PARKINSON et al. (1967) ont trouvé des différences assez nettes entre Mucorales de la litière, de l'humus et des horizons minéraux d'un sol sous *Pinus nigra*).

III. — CONCLUSIONS

La démarche commencée dans cette note apparaît prometteuse, une différenciation nutritionnelle très nette ayant pu être mise en évidence dans un groupe de champignons que l'analyse des successions faisait considérer comme homogène. Le cas est d'autant plus intéressant que la microflore étudiée est très générale dans les litières de conifères (voir par exemple PARKINSON et al. (1967), SODERSTROM et BAATH (1978)) et que les groupes nutritionnels mis en évidence y sont toujours représentés, avec des différences spécifiques dont la signification est à rechercher.

La suite de nos recherches étendra ces résultats à d'autres constituants de la microflore et à d'autres types d'activité. Toutefois les informations obtenues sur les Mucorales nous engagent à rechercher dès maintenant une explication écologique aux différences nutritionnelles observées dans ce groupe.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'Équipe de Recherches associée au CNRS 848 «Écologie microbienne».

Nous remercions tout particulièrement Mme Colette MOULIN pour sa collaboration technique au cours de ces travaux.

BIBLIOGRAPHIE

- BARNETT J.A., 1976 — The utilization of sugars by yeasts. *Advan. Carbohydrate Chem. Biochem.* 32: 125-234.
- GAMS W., 1977 — A key to the species of *Mortierella*. *Persoonia* 9: 381-391.
- GOURBIERE F., 1974 — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de Sapin (*Abies alba* Mill.). 2. Variations saisonnières de la microflore des aiguilles tombantes. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 90: 325-333.
- GOURBIERE F., 1975 — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de Sapin (*Abies alba* Mill.). 3. Microflore des aiguilles vivantes. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 91: 429-441.
- GOURBIERE F., 1979 — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de Sapin (*Abies alba* Mill.). 4. Microflore de la litière. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 95: 23-33.
- GOURBIERE F., 1980 — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de Sapin (*Abies alba* Mill.). 5. Synthèse des études précédentes. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 96: 35-42.
- KUHLMAN E.G., 1969 — Mucorales isolated from Pine root bark and wood. *Can. J. Bot.* 47: 1719-1723.
- PARKINSON D. and BALASOORIYA I., 1967 — Studies on fungi in a pinewood soil. I. Nature and distribution of fungi in the different soil horizons. *Rev. Écol. Biol. Sol.* 4: 463-478.
- PERLMAN D., 1965 — The chemical environment for fungal growth. 2. Carbon sources. In «The Fungi, an advanced treatise», AINSWORTH G.C. and A.S. SUSSMAN ed., Academic Press, New York and London, vol. 1: 479-489.
- SODERSTROM B.E. and BAATH E., 1978 — Soil microfungi in three Swedish coniferous forests. *Holarctic Ecology* 1: 62-72.